

深海微生物の特徴と生産する酵素の高水圧適応メカニズム



かとう・ちあき

立教大学大学院理学研究科修士課程修了、東京大学より農学博士の学位授与。
ゼリア新薬工業株式会社中央研究所等を経て、現在国立研究開発法人・海洋研究
開発機構、シニア研究員。

加 藤 千 明

1. はじめに

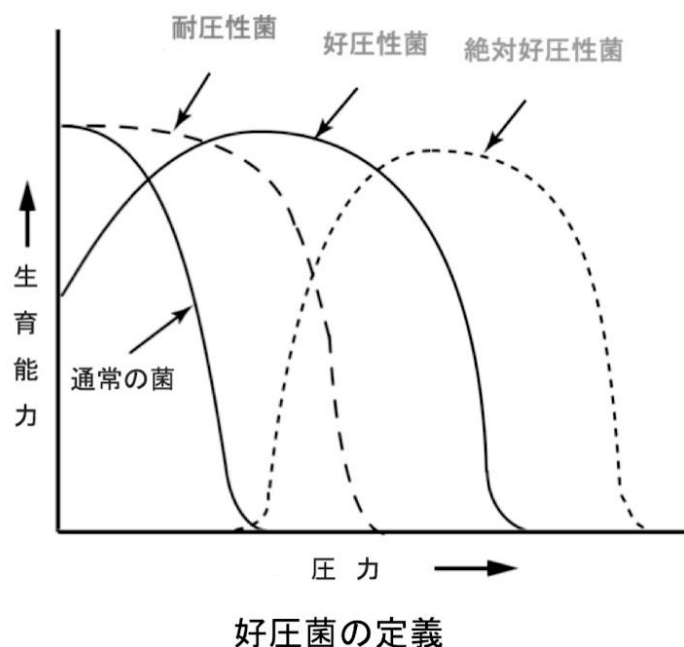
水の中にものを沈めると水の重さがかかってくる。これが水圧である。水の重さは 1 cm^3 で約 1 g なので、 10 m の水の底では、面積 1 cm^2 （親指の爪ぐらいの広さ）に約 1 kg の水圧がかかることになる。この圧力の単位 1 kg/cm^2 を大気圧に換算して、1 気圧と定義される。今日では圧力の国際単位がパスカル（Pa）で表示されることが決まっているので、それにならない本稿では、水圧の表記を $1\text{ 気圧} \simeq 0.1\text{ MPa}$ （メガパスカル）として、MPa 単位で表わすこととした。

さて、私たちの住む「地球」について俯瞰してみると、その表面積の約 7 割

の部分が海洋であり、その海洋のほぼ9割の部分が、深度1,000 mを超える深海世界である。こうして考えてみると「地球」というのは、「地の球」というよりはむしろ「水の球＝水球」といった方がふさわしく思える。その海洋の平均水深は約3,800 mであるので、海洋全体としては平均して約38MPaの高圧力下にさらされた世界ということになる。この圧力は、先ほどのたとえでいうと、私たちの親指の爪ほどの面積に、約380 kgほどの物体が乗っている重さとなる。とても人間が生きていけるような環境ではない。一方、地球表層の約7割が海洋環境であることを考えると、もし宇宙人がいたとして、闇雲に地球にやってくるとすると、10回の訪問のうち7回は海洋環境に到着するという計算になり、従って、宇宙人たちは、そこで出会う深海の生物こそがこの惑星「地球」を代表する生き物であると思うことであろう。すなわち、高水圧環境下にさらされた深海こそ、私たちの惑星「地球」を象徴する世界であるということに気づく。しかしながら、私たちの知識は、陸上や浅海の世界のことと比べてあまり深海世界のことを知らない。それは、私たちの世界と深海世界との間には「高水圧」という大きな壁が存在していて、私たち大気圧下に適応している人類にとっては、容易に深海へアクセスできなかったということがその主な原因であった。

しかしながら、近代急速に科学技術の開発が進み、19世紀の末頃には、深海底からドレッジ法（海底の地面の表層を削ってサンプリングする方法）による生物採取が試みられ、これまで砂漠のような無生物の世界であると思われていた深海世界にも、多種多様な生物が生息していることが知られるようになった。そして、前世紀の中頃、1950年には、アメリカの微生物学者たちにより、深海底には高水圧下の世界に好んで生息する微生物、好圧性微生物が存在するであろうことが予測された。その後約四半世紀を経て、微生物の高圧力培養技術の確立や各種の有人、無人潜水調査船等の開発・運用がおこなわれるようになり、ようやく1970年代後半に米国スクリプス海洋研究所のアート・ヤヤノス博士らにより、フィリピン海溝やマリアナ海溝などの超深海域から、大気圧下よりも高圧を好んで生育する新規の好圧性微生物の分離に成功したのである¹⁾。それまで、深海底サンプルから分離された微生物の多くは、単に耐圧性が高いというだけで、大気圧下でも良好に生育できるものであったが、ヤヤノス博士らにより大気圧下では全く生育できない「絶対好圧菌」も発見され、深海底には高圧力環境下に適応した新奇な生命世界が広がっていることが確認された。第1図に、微生物における生育能力と圧力との相関を図示し、それぞれ、耐圧菌、

好圧菌、絶対好圧菌の定義を示した。またあわせ、微生物の加圧培養に利用される加圧容器各種の写真を紹介した。



第1図. 好圧菌の定義と、好圧菌培養のために利用される各種加圧容器（右写真）

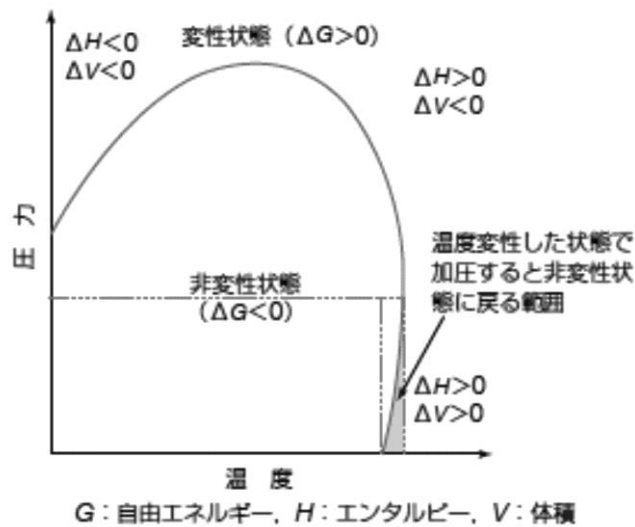
2. 深海微生物の高圧力適応戦略

一般的に、高圧力条件は生物にネガティブな効果をもたらすことが多い。加圧により微生物を殺菌する方法として、高圧殺菌法が普及しているが、これは圧力により食品等に混入している微生物を失活させ、食品等を腐敗から守るという効果をもたらす。微生物殺菌法としては、昔から加熱による殺菌法が広く普及してきているが、対象食品によっては加熱によりタンパク質等の素材の変性があり、・栄養分の損失が起こる、・異臭が発生し風味が失われる、・異常物質が生成される、更には・エネルギーの大量消費が必要、などの種々の問題点が指摘されている。そこで、こうした加熱加工の手法に対抗して、非加熱加工が脚光を浴びるようになってきたが、なかでも高圧殺菌法は食品加工に応用されることで大きな成功を収めてきた分野である²⁾。加熱加工と高圧力加工とでは、いずれも生物に対してネガティブな効果をもたらすが、対象素材に対するダメージの蓄積が大きく異なる。例えば、タンパク質に対しては、加熱では不可逆

的な変性をもたらす活性を回復させることは不可能であるが、加圧では微生物が失活する程度の圧力（500 MPa 程度）までは、多くの場合可逆的で、加圧下では活性が失われていても大気圧下に戻すと活性が回復する。すなわち、生物に対する圧力効果は同じネガティブな方向に向かうとしても、加熱効果と比較して非常にマイルドである。

第2図に、タンパク質の変性における圧力と温度の効果を示した³⁾。図中、着目すべき箇所を点線で示したが、タンパク質が変性する温度条件で加圧すると非変性（ネィティブ）な状態に戻るといふ領域が存在する。すなわち、加圧の効果として、対象物質に対してあたかも温度を下げたかのような状態をもたらすということがある。このことは、対象物質がタンパク質である場合だけではなく、微生物の殺菌プロセスや生育に対する影響等でも同様な効果をあたえていることが確認されている。微生物の殺菌では、大気圧下で死滅する温度にある程度の圧力を付加すると殺菌効果が失われることや、また微生物の生育に対してもその生育上限温度において、加圧すると生育が復活し加圧下での上限温度が上昇するという実験的な結果が得られている⁴⁾。

加圧効果が細胞生物学的に温度降下と同様な現象をもたらすもう一つの証拠として、細胞膜の流動性との相関があげられる。一般に細胞が低温環境に適応するためには、細胞膜の低温液晶化を防ぐために、細胞膜の主要構成成分である脂肪酸において含有飽和脂肪酸を固化温度がより低温側となる不飽和脂肪酸へと作り替えていくことが知られている。細胞を加圧条件下においたときも同様に、圧力下における細胞膜の流動性を確保するために、含有脂肪酸の不飽和化をもたらしている⁵⁾。実際に、高圧環境下の深海から分離された好圧菌ではその細胞膜脂肪酸の不飽和化率が極めて高く、70%を超える不飽和脂肪酸を含有しているものも多く存在している。ちなみに、生物の持つ主要生体物質である、核酸、タンパク質、脂肪酸の3つの物質の圧力効果を比較すると、脂肪酸がもっとも圧力に対して感受性が高く、深海の水圧である50~100 MPaの範囲の圧力下で顕著な構造変化を受ける。そうした意味で、深海生物は細胞膜で環境圧力を検知していて、膜含有の脂肪酸の組成で圧力のセンシングを担っていると考えられている。

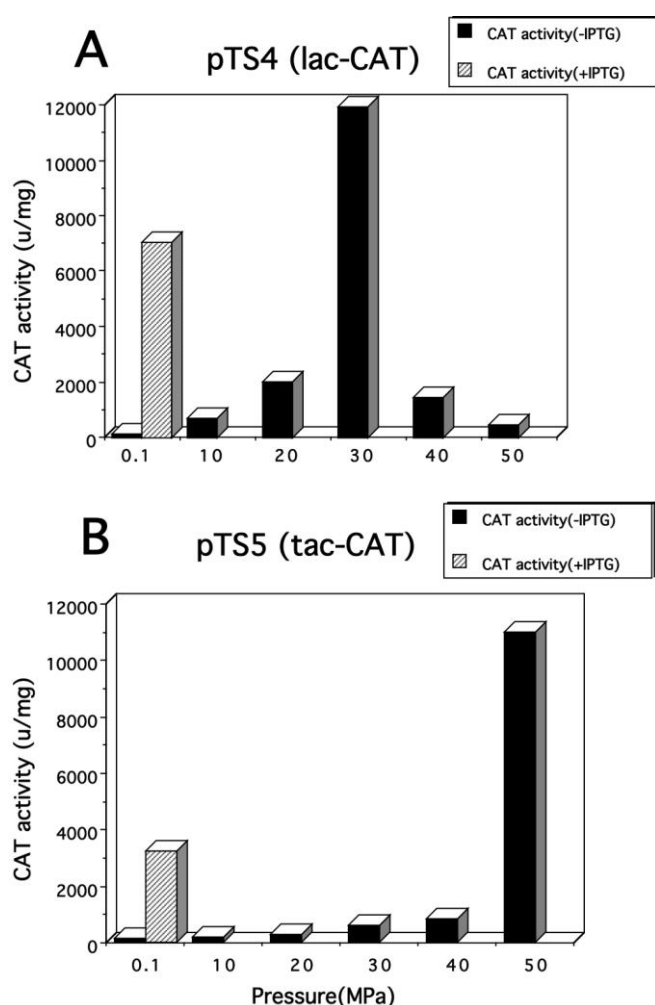


第2図. タンパク質の変性に対する圧力と温度の効果

3. 加圧応答する遺伝子

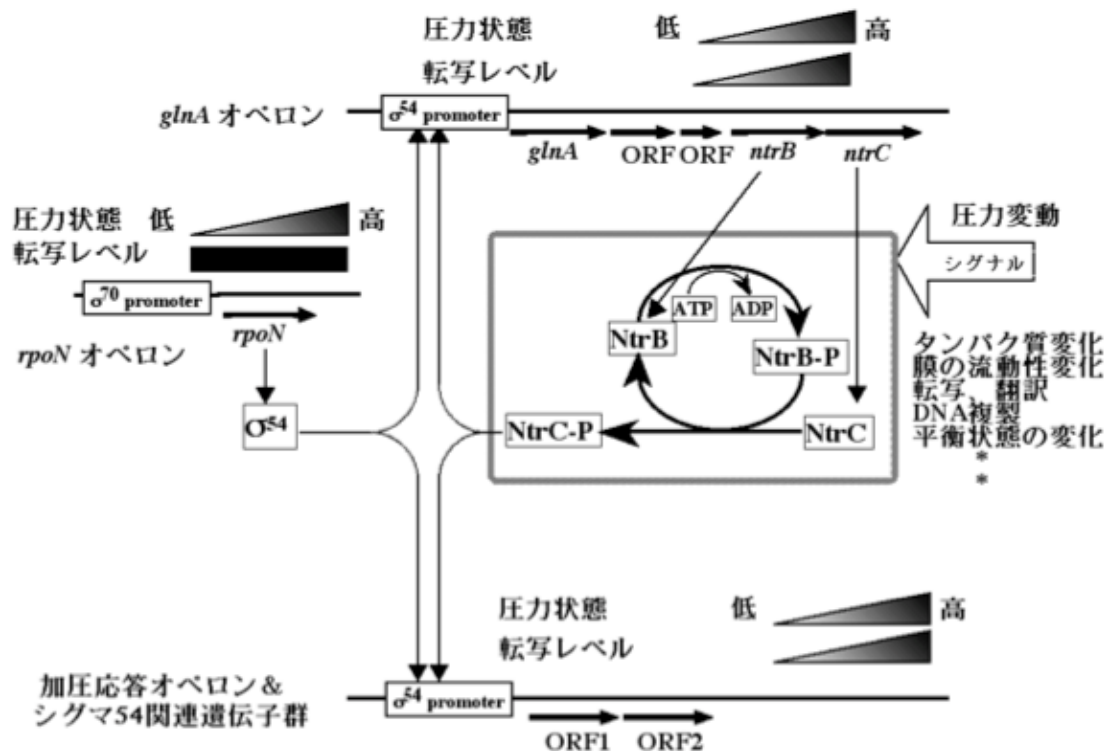
深海微生物の遺伝子発現応答はその生育圧力環境下によってコントロールされていることが、1989年に Bartlett らにより報告された⁶⁾。彼らは、大気圧でも生育できるモデルな好圧菌、*Photobacterium profundum* SS9 株を用いて、その外膜タンパク質 OmpH の発現が圧力により制御されていて、加圧下でのみ発現することを見いだした。こうした圧力制御の仕組みは、当初は深海に適応している微生物の特徴であるかのように考えられたが、その後、我々の大腸菌を材料として用いた実験により、遺伝子発現の圧力制御はどのような微生物においても起こりうるものであることが明らかとなった。この実験は、深海微生物のゲノム遺伝子から加圧応答するプロモーター配列（遺伝子発現の引き金を引く塩基配列領域）を検索することを目的としたモデル実験系を組み立てる過程で、遺伝子組換え系として一番よく利用されている大腸菌の宿主ベクター系を用いて行く中で発見された。驚くべきことに大腸菌を宿主とした遺伝子発現系として一番よく利用されている *lac* プロモーター系において、その発現が顕著に加圧応答する様が見られたのである⁷⁾。これらの遺伝子発現は、通常は発現誘導物質である IPTG（イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド、ガラクトース類似体）を添加することによって初めて発現誘導されるのであるが、*lac* プロモーターの場合 30 MPa、*tac* プロモーター（*lac* プロモーターを改変したもの）の場合 50 MPa の加圧下とすることによって、IPTG 抜きでも顕著に発現誘導されるとい

う事実を発見した⁸⁾ (第3図)。これらのプロモーターの下流には、遺伝子発現を阻害するタンパク質 LacI が4量体として結合しているオペレーターと呼ばれる領域が存在する。通常の条件下では、IPTG がこれに作用して LacI のオペレーター領域からの結合解除を行うことにより遺伝子発現を誘導するのであるが、高圧力の影響で LacI 複合体の構造が変形し、オペレーター部位への結合状態を維持できなくなり、その結果発現誘導が起こったと考えられた。この発見から、大気圧下に適応している微生物でも、加圧応答の遺伝子発現制御様式が広く存在することが示され、圧力印加によりこれまで見えてこなかった生命現象を見ようとする「圧力生理学」という新しい学問研究分野を開拓するきっかけともなった。



第3図. 加圧応答する *lac* 系プロモーター。遺伝子発現は、マーカー遺伝子として用いた CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 活性として表した。A: *lac* プロモーター、B: *tac* プロモーター

さて、その後の研究から、深海微生物における加圧応答する遺伝子もいくつも発見・報告されている。我々の研究室では、琉球海溝、深度 5,110 m より分離された、*Shewanella violacea* DSS12 株をモデル好圧菌として用いて、詳細に加圧応答する遺伝子発現機構について研究を行ってきた。本好圧菌は、その生育至適を 30 MPa、8°C にもつ好冷性好圧菌でもあり、大気圧から 70 MPa まで良好に生育できるので遺伝子発現の加圧応答を見るには非常に都合のいい微生物でもある⁹⁾。その結果、特に窒素代謝に関連のある RNA ポリメラーゼ RpoN が認識する遺伝子プロモーターの下流に、共通して加圧応答する遺伝子が存在することを発見し、RpoN 認識プロモーターの発現誘導に関わる転写因子、NtrC, NtrB の発現が引き金となって、加圧応答遺伝子発現カスケードが促進されるモデル（仲宗根・加藤モデル）を提唱した¹⁰⁾。第 4 図に、そのモデル図を示した。本モデルにおいては、環境圧力の変化を細胞膜中にわずかに存在している圧力センサータンパク質である NtrC が認識して、自己リン酸化される。そして、リン酸化された NtrC はそのリン酸を細胞質タンパク質である NtrB に伝達し、リン酸化された NtrB が RpoN（シグマ 54 プロモーター）を活性化させ、遺伝子発現を誘導するというメカニズムである。RpoN が認識するプロモーターの代表である *glnA* 遺伝子は、グルタミン酸合成酵素をコードしている遺伝子で、細胞が窒素飢餓状態になったときに特異的に発現する遺伝子である。この *glnA* 遺伝子の下流に転写因子、センサータンパク質をコードする *ntrB, C* 遺伝子がオペロンをなして存在しており、更に大量の NtrB, C タンパク質を発現させ、この加圧応答カスケードが回転する。深海環境は元々窒素飢餓状態であり、こうした窒素飢餓に対応する細胞応答メカニズムが加圧応答する遺伝子発現の一端を担っていることは非常に興味深い。



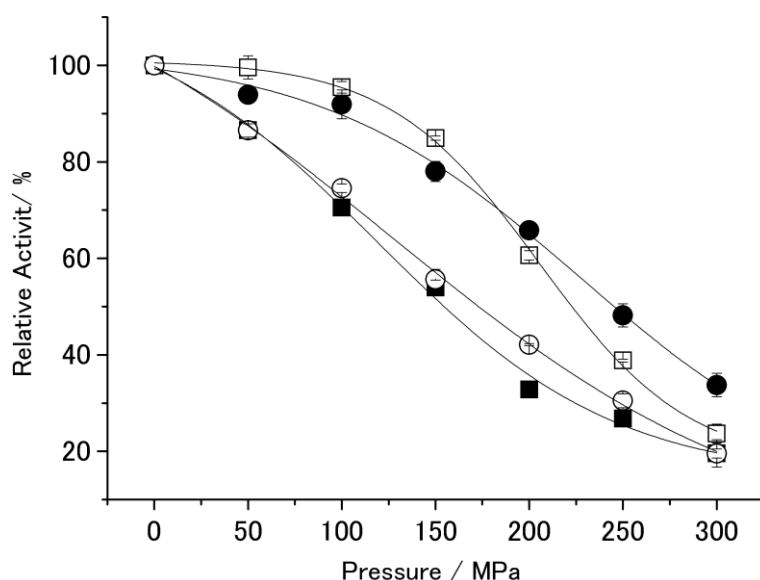
第4図. *Shewanella violacea* における加圧応答遺伝子発現様式（仲宗根・加藤モデル）。

4. 深海微生物酵素の高圧適応戦略

深海微生物の生産するタンパク質を調べていくと、高水压下の環境でより活性化されたり、その活性を維持しているものが多い。多くの大気圧環境に適応した微生物の酵素が、加圧に伴いその活性を失うのとは大きな違いである。深海微生物の高圧適応戦略を詳細にみていくと、前述した細胞膜脂肪酸の不飽和化、遺伝子発現の圧力制御などと絡み合って、その生産する酵素や機能タンパク質の耐圧化戦略も非常に重要なファクターとしてあげられる¹¹⁾。ここでは、我々の研究室を中心に調べられてきた、酵素の耐圧性と構造に関する最新の知見について紹介する¹²⁾。

我々は、マリアナ海溝チャレンジャー海淵より分離された絶対好圧性微生物 *Shewanella benthica* DB21MT-2 株の耐圧性の酵素タンパク質、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（IPMDH）について、アメリカのオネイダ湖で分離された常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 の IPMDH を陸上酵素のコントロールとして高圧

適応メカニズムの検討をおこなった。IPMDH は、生物に必須なアミノ酸であるロイシンの生合成過程で働く重要な酵素タンパク質である。陸上酵素と絶対好圧菌の同酵素とはアミノ酸配列や立体構造はほとんど同様であったが、前者は 150 MPa では活性が 50%程度まで減少する圧力感受性であるのに対して、後者は 90%近くの活性を維持している耐圧性酵素である。そこで、酵素の結晶化を行い、ダイヤモンドアンビルセルとシンクロトン放射光の高エネルギー高輝度のX線とを用いて、高压条件下におけるタンパク質立体構造を調べたところ、常圧菌の酵素において、高圧力によってその活性部位の裏側のくぼみの部分に水分子がクサビのように割込んで行く様子がみられた。その水分子の場所を確認すると、266 番目のアミノ酸付近に存在し、そこは常圧菌では親水性の Ser であるものが絶対好圧菌では疎水性の Ala であった。そこで、常圧菌の酵素の Ser を Ala に置き換えた人工変異型酵素（陸上酵素 S266A）を作成し高压分光光度計を用いてその耐圧性を調べたところ、絶対好圧菌酵素並の耐圧性を獲得していた。また、逆に絶対好圧菌酵素の Ala を Ser に置き換える（深海酵素 A266S）と耐圧性を失った。すなわち、本酵素の全体で 364 個のアミノ酸のうち、たった 1 つのアミノ酸の違いで深海型酵素が陸上型酵素になり、逆に陸上型酵素が深海型酵素になったりする事が明らかとなった（第 5 図）。

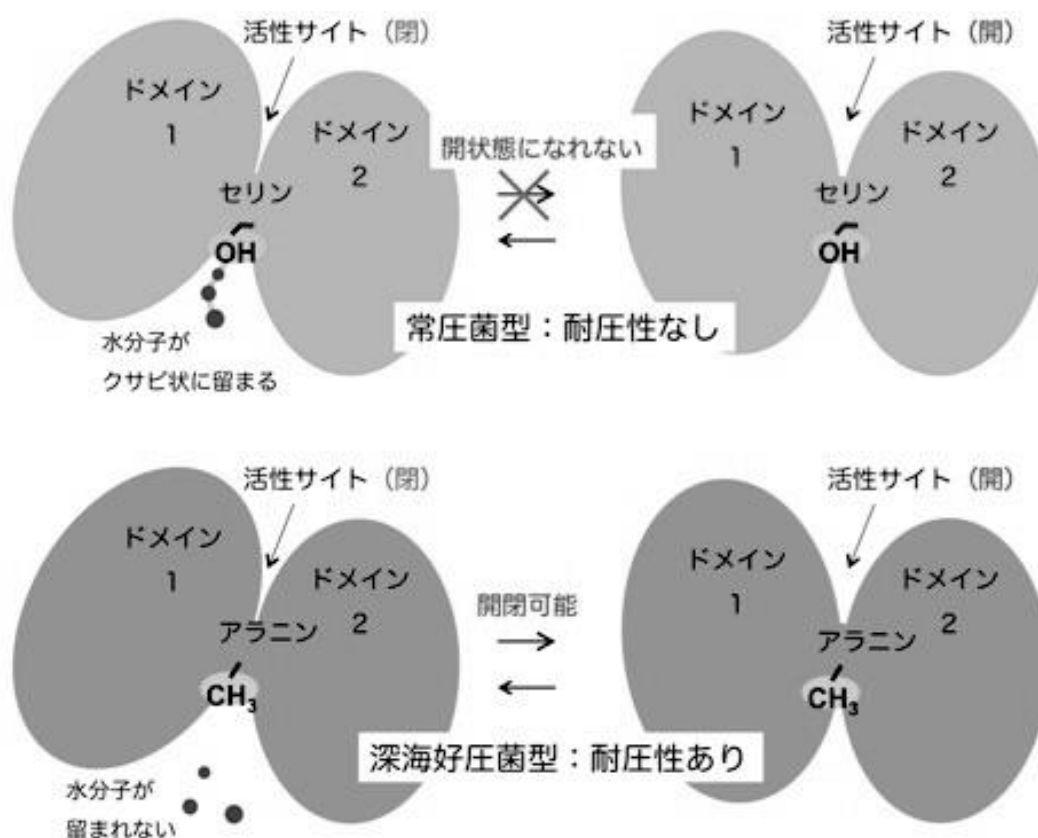


第 5 図. 各変異酵素の各圧力下での活性比較。

●; 深海酵素、○; 深海酵素 A266S、■; 陸上酵素、□; 陸上酵素 S266A

さらに、これらの変異型酵素を結晶化し高压条件下における立体構造の変化を調べたところ、266 番目のアミノ酸が陸上酵素型の Ser の場合、活性中心の裏側に存在するくぼみ部分に 3 つの水分子が留まるのに対し、深海酵素型の Ala の場合は、これらの水分子が留まらないことが観測された。つまり陸上酵素が圧力に対して感受性であるのは、加圧条件下においてこのくぼみ部分に水分子がクサビ状に侵入し、親水性アミノ酸の Ser と水素結合することによって酵素分子の動きが抑制されることで酵素活性が阻害されるという現象が起こったと推定された。それに対して深海酵素ではこの部分が疎水性アミノ酸の Ala であるため、加圧下でも水分子が結合出来ずクサビ状に留まらないため、活性発現に重要な分子の柔軟性が補償されているというメカニズムが示された（第 6 図）。

今回の結果から、全体で 364 個あるアミノ酸のわずか 1 個の違いで深海酵素が陸上酵素の性質を持ったり、その逆に陸上酵素が深海酵素になったりする事がわかった。これまで長い間、深海生物の深海高压下への適応戦略というのは、とても複雑でいくつもの要素が絡み合っていると考えられてきていたが、タンパク質個々の機能に焦点を当てれば、意外と単純にアミノ酸のレベルで議論ができることが示された。本結果から、高压構造解析の結果を利用して、既知のタンパク質に深海生物の耐压機能を付加するという技術的な可能性を示すことができた。今後は、基礎研究の面からは、タンパク質における高压適応の一般則を導き出すという研究を推進するとともに、応用面としては、圧力を利用するバイオテクノロジー分野において、工業利用酵素に耐压性を付与するという技術開発がさらに進んでいくことが考えられる。さらには、食品科学分野等での加圧によるアレルギー物質の分解や除去、高压バイオリアクターなどへの利用などへの展開も期待される。



第6図. 陸上型酵素（上）と深海型酵素（下）の加圧下における水分子侵入モデル。陸上酵素の場合、加圧によりくぼみ部分のセリンに水分子が水素結合して留まってしまうため、IPMDH 分子の運動性が抑制され活性が減少する。深海酵素の場合は疎水性のアラニンであるため、水分子が水素結合出来ずくぼみ部分に留まらないため活性中心の開閉はスムーズに行われることで高圧下でも反応が進行する（耐圧性を示す）。

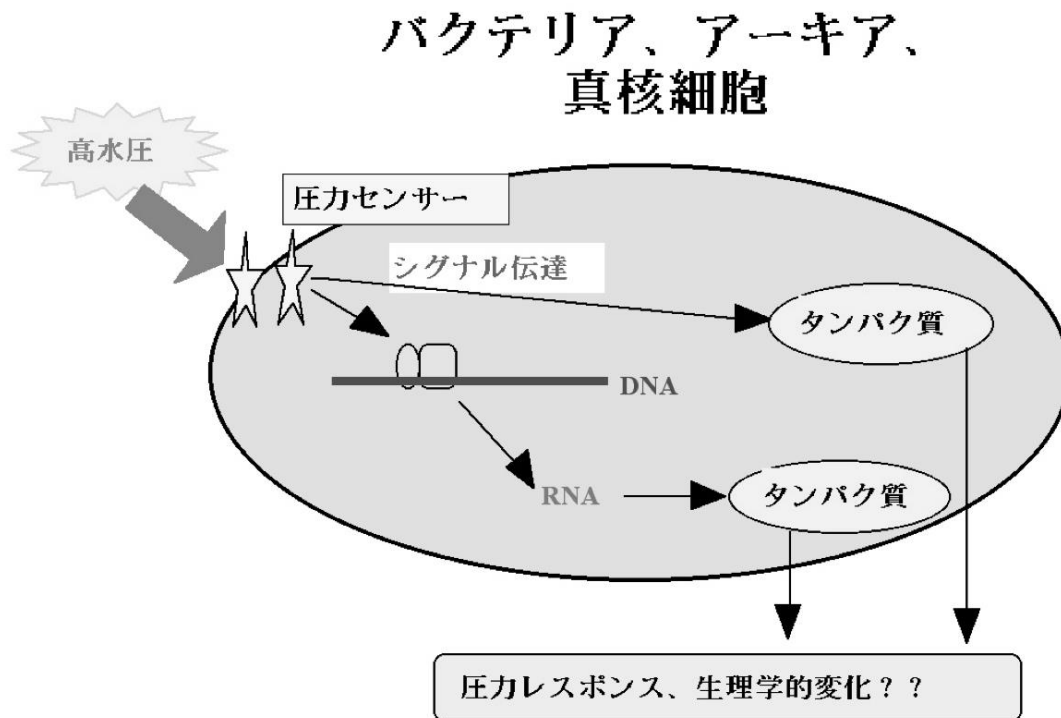
5. おわりに

これまで述べてきたように、圧力という条件は個体としての生物だけではなく、組織や細胞、また細胞を形成する生体分子に至るまで、あらゆる次元で影響を与えていることがわかる。現在では、種々の高圧測定装置の開発もすすみ、更に詳細にたとえば、タンパク質の立体構造の圧力変化やアミノ酸に結合・解離する水分子のひとつひとつの挙動まで、詳細に観察することが可能となってきた。そうしたことを含め、高圧力下での生命現象を明らかにすることを目的として、「Piezophysiology＝圧力生理学」という新しい学問分野の提唱がなされた¹³⁾。圧力生理学というのは、生きた細胞や生物個体そのものに圧力を加

え、そのレスポンスを解析することにより今まで生物学的に理解されていない新たな生命現象を解明しようとするものである。第7図に、圧力生理学の概念図を示した。本稿にて記述した、細胞膜脂質の不飽和化戦略や、遺伝子発現の圧力制御、タンパク質の圧力適応等に関する研究なども、圧力生理学研究の範疇に含まれる。これまで、圧力生物科学分野では、その多くが既知のモデルタンパク質を用いた研究を中心としていたが、元々高水压環境に適応して生息している深海生物や微生物を材料とした研究例は筆者らの研究例を除けば、ほとんどなされていない。深海の生き物たちは、その長い深海環境に対する適応戦略の中で、その生育に必須の機能を有する生体物質を耐圧性に作り替えてきていることが考えられ、今後ますますこうした生物を材料とした研究が高圧力研究の中で重要な位置を占めていくことは間違いない。

今後は、高圧下での構造の変化などから、好圧性微生物の有する生体物質の耐圧化戦略の一般則を導き出し、体積変化と生体物質の高圧下での安定性との相関を明らかとしていくことが望まれる。今後ますます、圧力生理学の研究材料としての好圧微生物や深海生物などの利用がなされていくことであろう。

最後に本研究は、私の研究の師匠で、極限環境微生物学の創始者でもある故掘越弘毅先生（本年3月16日ご逝去）のご指導の下に達成された成果のひとつであります。これまで先生から受けたご指導と恩義に感謝申し上げますと共に、心よりご冥福を祈ります。



第7図. 圧力生理学の概念図

参考文献

- 1) A.A. Yayanos, A.S. Dietz, R. Van Boxtel, Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*, **205**, 808-810 (1979).
- 2) 重松亨、西海理之 (監修)、「進化する食品高压加工技術」、エヌ・ティー・エス、東京都、(2013).
- 3) J.L. Markley, D.B. Northrop, C.A. Royer (Eds.), In: "High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology", Oxford University Press, New York, pp. 44-61 (1996).
- 4) 加藤千明、柳林美樹、稲田哲哉、平清、菊間敏雄、鈴木掀三郎、掘越弘毅、微生物の成育における圧力と温度の影響について。「高压生物科学と高压技術」、鈴木敦士、林力丸 (監修)、さんえい出版、京都市、pp. 15-22 (1997).
- 5) E.F. DeLong, A.A. Yayanos, Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science*, **228**, 1101-1103 (1985).
- 6) D. Bartlett, M. Wright, A.A. Yayanos, M. Silverman, Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature*, **342**, 572-574 (1989).

- 7) C. Kato, T. Sato, M. Smorawinska, K. Horikoshi, High pressure conditions stimulate expression of chloramphenicol acetyltransferase regulated by the *lac* promoter in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 91-96 (1994).
- 8) T. Sato, C. Kato, K. Horikoshi, Effect of high pressure on gene expression by *lac* and *tac* promoters in *Escherichia coli*. *J. Mar. Biotechnol.*, **3**, 89-92 (1995).
- 9) Y. Nogi, C. Kato, K. Horikoshi, Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **170**, 331-338 (1998).
- 1 0) K. Nakasone, A. Ikegami, H. Kawano, R. Usami, C. Kato, K. Horikoshi, Transcriptional regulation under pressure conditions by the RNA polymerase σ^{54} factor with a two components regulatory system in *Shewanella violacea*. *Extremophiles*, **6**, 89-95 (2002).
- 1 1) C. Kato, T. Sato, F. Abe, E. Ohmae, H. Tamegai, K. Nakasone, K.S. Siddiqui, T. Thomas, Protein adaptation to high-pressure environments. In: Protein Adaptation in Extremophiles. Molecular Anatomy and Physiology of proteins series (Eds. T. Thomas, K.S. Siddiqui), Nova Science Publisher, New York, pp. 167-191 (2008).
- 1 2) Y. Hamajima, T. Nagae, N. Watabane, E. Ohmae, Y. Kato-Yamada, C. Kato, Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution. *Extremophiles*, **20**, 177-186 (2016).
- 1 3) F. Abe, C. Kato, Barophysiology (Piezophysiology). In “Extremophiles in Deep-Sea Environments” (Eds. K. Horikoshi and K. Tsujii), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 227-248 (1999).